دوره ۲۰، شماره ۶۳، پاییز ۱۳۹۶، صفحات: ۱۹-۹

مقاله پژوهشی

سنجش میزان تولید آنزیم پروتئیناز در گونه‌های کاندیدای جداشده از کاندیدیازیس دهانی بیماران سرطانی دریافت‌کننده شیمی‌تراپی بیمارستان‌های تنکابن و رامسر

سمیه مقیمیان[1*]، آیت اله نصرالهی عمران[2]، شهربانو کیهانیان[3]

[1] کارشناسی ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاداسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران
[2] دانشیار، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاداسلامی واحدتنکابن، تنکابن، ایران
[3] استادیار و فوق تخصص خون و سرطان بالغین، دانشگاه آزاداسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۱۷ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۷/۰۲/۱۲

چکیده

مقدمه: کاندیدیازیس یک عفونت قارچی شایع است که توسط گونه‌های مختلف کاندیدا ایجاد می‌شود. تولید آنزیم‌های خارج سلولی نظیر پروتئیناز به‌عنوان فاکتور بیماری‌زا نقش به‌سزایی در چسبندگی و نفوذ مخمر به میزبان مستعد دارد. در این راستا، هدف از پژوهش حاضر بررسی میزان تولید آنزیم پروتئیناز در بیماران سرطانی مبتلا به کاندیدیازیسمی دهانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۲۰ نمونه سواپ دهانی از بیماران سرطانی و غیرسرطانی مبتلا به کاندیدیازیس مراجعه‌کننده به مرکز انکولوژی بیمارستان رامسر و تنکابن در سال ۱۳۹۴-۱۳۹۳ جمع‌آوری گردید. این نمونه‌ها در محیط سابورو دکستروز آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل کشت داده شدند و ایزوله‌های مخمری با استفاده از روش فنوتایپیک مورد شناسایی قرار گرفتند. در ادامه برای ارزیابی فعالیت آنزیمی پروتئینازی از محیط اختصاصی استفاده گردید. قطر هاله تشکیل‌شده در اطراف هر کلونی نیز به‌منظور تولید آنزیم اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: از ۲۰ نمونه جمع‌آوری‌شده، از گروه بیماران سرطانی مبتلا به کاندیدیازیس دهانی ۱۹ ایزوله مخمری کاندیدا (۹۵ درصد) و از گروه شاهد شش ایزوله (۳۰ درصد) جدا گردید. فراوانی کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا به‌ترتیب معادل ۱۶ (۸۴ درصد) و ۳ (۱۶ درصد) بود. در افراد غیرسرطانی تمام ایزوله مخمری جداشده به‌عنوان کاندیدا آلبیکنس شناسایی شد. میانگین قطر هاله در اطراف سلول‌های مخمری تولیدکننده آنزیم پروتئیناز در افراد سرطانی مبتلا به کاندیدیازیس دهانی نسبت به گروه غیرسرطانی معادل ۲/۲۱ میلی‌متر به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: تولید آنزیم پروتئیناز به‌عنوان یک فاکتور ویرولانس مهم در ایجاد بیماری کاندیدیازیس دهانی در افراد سرطانی به مراتب بیشتر از افراد غیرسرطانی بود.

کلمات کلیدی: باکتو آگار، پپتون آگار، پروتئیناز، سرطان، سرطان هماتولوژیک، کاندیدیازیس دهانی، کروم آگار، گونه‌های کاندیدا، نقص ایمنی

* **نویسنده مسئول:** سمیه مقیمیان، گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاداسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران. تلفن: ۰۹۱۱۱۹۳۲۴۴۹؛ ایمیل: negin.moghimian@yahoo.com

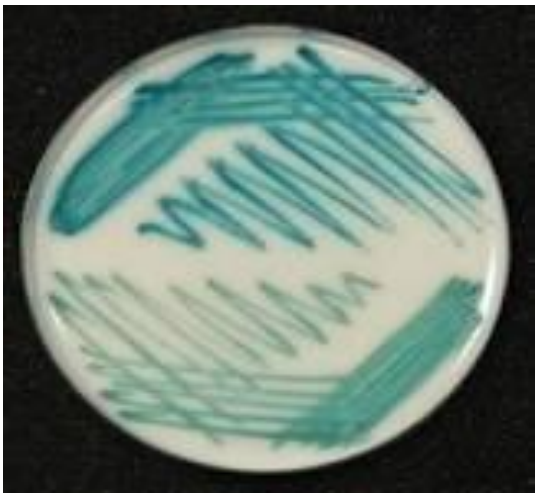
مقدمه

در سال‌های اخیر به دلیل افزایش فاکتورهای مستعدکننده و افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی، عفونت‌های فرصت‌طلب ناشی از گونه‌های کاندیدا افزایش قابل ملاحظه‌ای یافته‌اند. گستردگی کاندیدیازیس به‌صورت عفونت‌های سطحی- مخاطی تا عفونت‌های سیستمیک منتشرشده مشاهده می‌گردد. بر مبنای عوامل سبب‌شناسی بیماری، قارچ‌های مخمری متعلق به جنس کاندیدا می‌باشند. کاندیدا آلبیکنس شایع‌ترین جنس بیماری‌زا است و پس از آن گونه‌های کاندیدا گلابراتا و کاندیدا کروزی رو به افزایش هستند و در موارد کمتر کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا تروپیکالیس مشاهده می‌شود (۱). کاندیدا آلبیکنس به‌عنوان عامل ایجادکننده یک عفونت شایع در بیماران سرطانی مطرح می‌باشد. از این مخمر به‌عنوان فلور نرمال سطوح مخاطی نظیر دهان، دستگاه گوارش و واژن یاد می‌شود؛ اما شرایط خاص مانند استفاده زیاد از آنتی‌بیوتیک‌ها، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی منجر به تکثیر بیش از حد آن گشته و خطر ابتلا به عفونت را افزایش می‌دهد (۲،۳). کاندیدیازیس دهانی شایع‌ترین شکل کاندیدیازیس در بیماران مبتلا به سرطان و بیماران دریافت‌کننده داروهای تضعیف‌کننده سیستم ایمنی می‌باشد (۴،۵). آنزیم آسپارتیل پروتئیناز ترشحی (SAP2) کاندیدا آلبیکنس نقش محوری در اتصال، تهاجم و بیماری‌زایی این مخمر فرصت‌طلب دارد. کاندیدا آلبیکنس قادر به سنتز پروتئینازهای با قدرت تخریب الاستین که در مقاومت علیه سیستم ایمنی بدن و تهاجم به سطوح مخاطی بافت میزبان نقش دارند می‌باشد (۳،۶،۷). آسپارتیل پروتئیناز (Sap) یکی از آنزیم‌های پروتئیناز خارج سلولی است. به‌طور کلی این دسته از آنزیم‌ها، هیدرولیزکننده پیوند (Co-NH) در پروتئین‌ها می‌باشند (۸،۹). با توجه به موارد بیان‌شده، هدف از پژوهش حاضر سنجش تولید آنزیم پروتئیناز گونه‌های کاندیدای جداشده از بیماران سرطانی دریافت‌کننده شیمی‌تراپی مبتلا به کاندیدیازیس دهانی و مقایسه میزان تولید آنزیم با گروه کنترل (افراد غیرسرطانی) است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به‌صورت توصیفی- مقطعی در سال ۹۴-۱۳۹۳ در ارتباط با بیماران مراجعه‌کننده به مراکز درمانی شهر تنکابن و رامسر انجام شد. جامعه آماری ۲۰ فرد سرطانی و ۲۰ فرد غیرسرطانی با عارضه کاندیدیازیس دهانی بودند. نمونه‌برداری توسط سواب استریل صورت گرفت و نمونه‌ها با قراردادن سواب در لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل به آزمایشگاه انتقال داده شدند. کشت نمونه‌ها بر روی محیط سابورو دکستروز آگار (Merck، آلمان) حاوی کلرامفنیکل انجام پذیرفت. در ادامه، پلیت‌ها به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و کلونی‌های مخمری رشدیافته بر روی محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل با استفاده از محیط کروم آگار کاندیدا (Merck، آلمان) مورد شناسایی قرار گرفتند (۱۰). در این مطالعه از ایزوله استاندارد کاندیدا آلبیکنس (PTCC 5027) به‌عنوان کنترل استفاده شد. به‌منظور سنجش تولید آنزیم پروتئیناز مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از محیط سابورو دکستروز براث در ظروف استریل ریخته شد و هریک از ایزوله‌های مخمری رشدیافته در این محیط کشت داده شدند. سپس، ظروف به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور متحرک ۲۶ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. پس از این مدت سلول‌های مخمری به وسیله بافر سالین فسفات دو بار شسته شدند و در نهایت یک سوسپانسیون حاوی 10^8

الف



ب

شکل ۱: الف. کاندیدا گلابراتا در کروم آگار، ب. کاندیدا آلبیکنس در کروم آگار

سلول تهیه گردید. در ادامه، مقدار ۱۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون سلولی به محیط کشت اختصاصی تولید آنزیم پروتئیناز شامل: ۱ درصد باکتو آگار، ۰/۱ درصد KH_2po_4، ۰/۵ درصد $MgSo_4$، ۱ درصد گلوکز و ۰/۱۶ درصد آلبومین سرم گاوی با Ph=۵ انتقال داده شد و به مدت پنج روز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس، پلیت‌ها با تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد فیکس شدند و رنگ‌آمیزی با آمیدوبلانک ۱/۲۵ درصد (۹۰ درصد متانول و ۱۰ درصد اسید استیک) صورت گرفت و مناطق واضح اطراف هر کلونی اندازه‌گیری شدند (شکل الف، ب) (۱۱،۱۲). در ادامه، نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov و همگنی واریانس‌ها با استفاده از آزمون Levene مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسات چندگانه میانگین از آزمون Duncan با سطح معناداری ۰/۰۰۵ استفاده شد. باید خاطرنشان ساخت که برای انجام کلیه آزمون‌های آماری، نرم‌افزار SPSS 18 به کار گرفته شد.

نتایج

از میان ۲۰ بیمار سرطانی، ۱۲ نفر زن (۶۰ درصد) و هشت نفر مرد (۴۰ درصد) بودند و ۲۰ فرد غیرسرطانی را ۱۰ زن (۵۰ درصد) و ۱۰ مرد (۵۰ درصد) شامل می‌شدند. میانگین و انحراف معیار سنی بیماران سرطانی و غیرسرطانی به‌ترتیب معادل ۸/۷۱±۵۲/۷۲ و ۱۰/۴۳±۵۴ به‌دست آمد. جدول ۱ و ۲ اطلاعات دموگرافیکی بیماران شرکت‌کننده در پژوهش حاضر را نشان می‌دهند. داده‌های جدول ۳ و شکل ۲ نیز حاکی از آن هستند که از میان ۱۹ فرد بیمار، ۱۱ نفر (۵۷/۹ درصد) زن و هشت نفر (۴۲/۱ درصد) مرد و از میان شش فرد بیمار، چهار نفر (۶۶/۶۷ درصد) زن و دو نفر (۳۳/۳۳ درصد) مرد بودند. علاوه‌براین، داده‌های جدول ۴ و شکل ۳ نشان می‌دهند که از میان ۱۹ فرد بیمار، چهار نفر (۲۱/۰۵ درصد) در رده سنی ۴۵-۴۰ سال، شش نفر (۳۱/۵۸ درصد) در رده سنی ۵۰-۴۶ سال، چهار نفر (۲۱/۰۵ درصد) در رده سنی ۵۵-۵۱ سال، دو نفر (۱۰/۵۳ درصد) در رده سنی ۶۰-۵۶ سال و سه نفر (۱۵/۷۹ درصد) در رده سنی ۷۰-۶۶ سال قرار داشتند و از تعداد شش فرد بیمار، یک نفر (۱۶/۶۷ درصد) در رده سنی ۴۵-۴۰ سال، یک نفر ± (۱۶/۶۷ درصد) در رده سنی ۵۰-۴۶ سال، یک نفر (۱۶/۶۷ درصد) در رده سنی

جدول ۱: اطلاعات دموگرافیک افراد سرطانی مبتلا به کاندیدیازیس دهانی

ردیف	جنسیت	سن	نوع سرطان	نوع درمان
۱	مرد	۵۴	هماتولوژیک	شیمی‌درمانی
۲	مرد	۵۰	هماتولوژیک	شیمی‌درمانی
۳	زن	۴۶	اعضا (تومورتوپر)	رادیوتراپی
۴	مرد	۷۰	اعضا (تومورتوپر)	شیمی‌درمانی
۵	زن	۴۵	اعضا (تومورتوپر)	شیمی‌درمانی
۶	زن	۵۱	اعضا (تومورتوپر)	شیمی‌درمانی
۷	زن	۴۰	اعضا (تومورتوپر)	رادیوتراپی
۸	مرد	۶۸	اعضا (تومورتوپر)	شیمی‌درمانی
۹	مرد	۵۶	اعضا (تومورتوپر)	رادیوتراپی
۱۰	زن	۴۹	اعضا (تومورتوپر)	رادیوتراپی
۱۱	زن	۵۱	اعضا (تومورتوپر)	شیمی‌درمانی
۱۲	زن	۵۰	هماتولوژیک	شیمی‌درمانی
۱۳	زن	۷۰	اعضا (تومورتوپر)	رادیوتراپی
۱۴	زن	۴۴	اعضا (تومورتوپر)	شیمی‌درمانی
۱۵	زن	۴۵	اعضا (تومورتوپر)	شیمی‌درمانی
۱۶	مرد	۴۸	اعضا (تومورتوپر)	شیمی‌درمانی
۱۷	مرد	۶۰	اعضا (تومورتوپر)	شیمی‌درمانی
۱۸	مرد	۵۵	هماتولوژیک	رادیوتراپی
۱۹	زن	۵۰	اعضا (تومورتوپر)	شیمی‌درمانی
۲۰	زن	۴۶	هماتولوژیک	رادیوتراپی

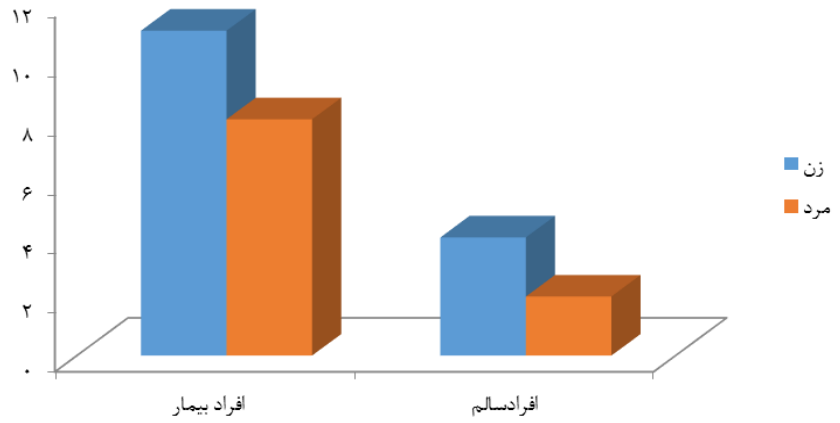
جدول ۲: اطلاعات دموگرافیک افراد غیرسرطانی مشکوک به کاندیدیازیس دهانی

ردیف	جنسیت	سن	نوع بیماری
۱	مرد	۴۵	آسم
۲	مرد	۴۰	بیماری قلبی
۳	زن	۵۳	رماتیسم
۴	زن	۵۵	دیابت
۵	زن	۴۶	بیماری قلبی
۶	مرد	۶۸	دیابت
۷	مرد	۶۵	تب مالت
۸	زن	۷۲	دیابت
۹	مرد	۶۵	بیماری قلبی
۱۰	مرد	۴۹	دیابت
۱۱	زن	۵۸	دیابت
۱۲	زن	۵۲	پسوریازیس
۱۳	زن	۴۰	پیوند اعضا
۱۴	مرد	۳۹	دیابت
۱۵	مرد	۴۵	چربی بالا
۱۶	زن	۴۷	دیابت
۱۷	زن	۵۳	رماتیسم
۱۸	زن	۷۷	دیابت
۱۹	مرد	۷۹	دیابت
۲۰	مرد	۶۸	تب مالت

تمامی این افراد علائم برفک دهانی داشتند. پس از انجام آزمایشات، از میان این افراد شش نفر از نظر کاندیدا مثبت بودند که از این شش کاندیدا برای انجام آزمون‌های آماری استفاده شد.

جدول ۳: نتایج آنالیز واریانس برای آنزیم پروتئیناز در بیماران سرطانی با نوع قارچ کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا

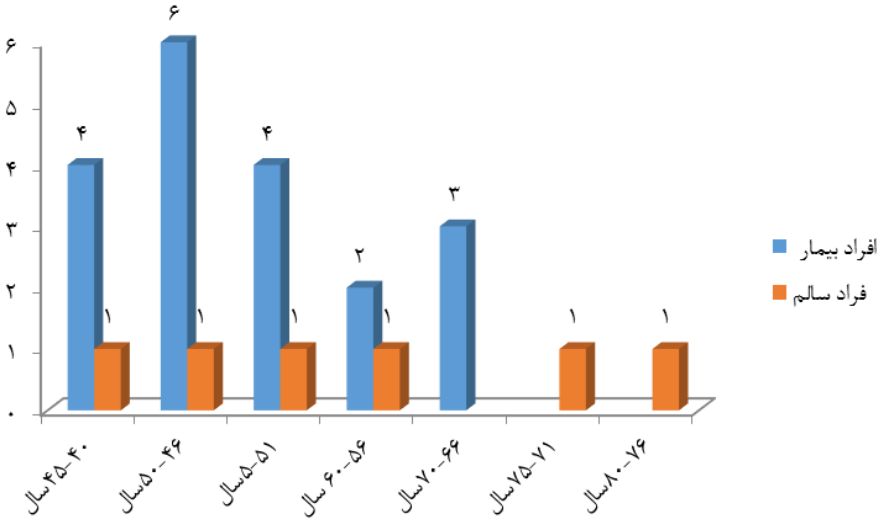
منبع تغییرات	مجموع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات	F	سطح معناداری	اندازه اثر Eta	توان آزمون
پروتئیناز تکرار اول	۰/۲۷۰	۱	۰/۲۷۰	۱/۹۵۰	۰/۱۸۱	۰/۱۰۳	۰/۲۶۱
پروتئیناز تکرار دوم	۰/۲۷۰	۱	۰/۲۷۰	۱/۹۱۸	۰/۱۸۴	۰/۱۰۱	۰/۲۵۷
پروتئیناز تکرار سوم	۰/۴۰۰	۱	۰/۴۰۰	۲/۹۳۰	۰/۱۰۵	۰/۱۴۷	۰/۳۶۵



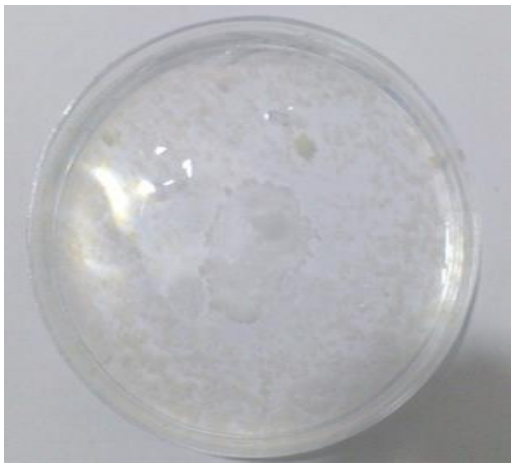
شکل ۳: فراوانی مطلق و نسبی افراد سرطانی و غیرسرطانی بر حسب جنس

جدول ۴: نتایج آنالیز واریانس آنزیم پروتئیناز تولیدشده بر حسب نوع سرطان (هماتولوژیک و سرطان اعضا)

منبع تغییرات	مجموع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات	F	سطح معناداری	اندازه اثر Eta	توان آزمون
پروتئیناز تکرار اول	۰/۹۲۴	۱	۰/۹۲۴	۹/۲۲۴	۰/۰۰۴	۰/۳۵۲	۰/۸۱۶
پروتئیناز تکرار دوم	۱/۰۲۱	۱	۱/۰۲۱	۱۰/۵۵۰	۰/۰۰۱	۰/۳۸۳	۰/۸۶۴
پروتئیناز تکرار سوم	۰/۹۶۴	۱	۰/۹۶۴	۹/۳۲۹	۰/۰۰۴	۰/۳۵۴	۰/۸۲۱



شکل ۳: فراوانی مطلق و نسبی بیماران سرطانی و غیرسرطانی بر حسب گروه‌های سنی



شکل ۴: هاله تشکیل‌شده آنزیم پروتئیناز

۵۵-۵۱ سال، یک نفر (۱۶/۶۷ درصد) در رده سنی ۴۵-۴۰ سال، یک نفر (۱۶/۶۷ درصد) در رده سنی ۶۰-۵۶ سال و یک نفر (۱۶/۶۷ درصد) در رده سنی ۷۰-۶۶ سال جای داشتند.

از سوی دیگر، نتایج فنوتیپی کشت ایزوله‌ها در محیط کروم آگار کاندیدا نشان داد که ۱۶ ایزوله به‌عنوان کاندیدا آلبیکنس (کلنی سبز کم‌رنگ) و سه ایزوله به‌عنوان کاندیدا گلابراتا (کلنی با رنگ ارغوانی تیره با کناره‌های صورتی) شناسایی شدند. میانگین قطر هاله در اطراف سلول‌های مخمری تولیدکننده آنزیم پروتئیناز جداشده از افراد سرطانی معادل ۲/۲۱ میلی‌متر و برای بیماران غیرسرطانی یک میلی‌متر بود (شکل ۴). باید عنوان نمود که نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه برای متغیرهای آنزیم پروتئیناز در بیماران سرطانی با نوع قارچ کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا به لحاظ آماری معنادار نبود. با توجه به سه بار تکرار آزمایش، میزان F محاسبه‌شده در سطح معناداری بیشتر از آلفای میزان‌شده Bonferroni (۰/۰۰۵) به‌دست آمد؛ بنابراین F محاسبه‌شده به لحاظ آماری معنادار نبود (جدول ۵). نتایج آنالیز واریانس برای متغیرهای آنزیم پروتئیناز تولیدشده بر حسب نوع سرطان (هماتولوژیک و سرطان اعضا) در جدول ۶ ارائه شده است. میزان پروتئیناز در دو نوع سرطان (هماتولوژیک و سرطان اعضا) با توجه به سه بار تکرار آزمایش

جدول ۵: فراوانی مطلق و نسبی افراد سرطانی و غیرسرطانی بر حسب جنس

جنسیت	افراد غیرسرطانی		افراد بیمار	
	درصد	تعداد	درصد	تعداد
زن	۵۷/۹	۱۱	۶۶/۶۷	۴
مرد	۴۲/۱	۸	۳۳/۳۳	۲
جمع کل	۱۰۰	۱۹	۱۰۰	۶

جدول ۶: فراوانی مطلق و نسبی بیماران سرطانی و غیرسرطانی بر حسب گروه‌های سنی

جنسیت	افراد غیرسرطانی		افراد بیمار	
	درصد	تعداد	درصد	تعداد
۴۵-۴۰ سال	۱۶/۶۷	۱	۲۱/۰۵	۴
۵۰-۴۶ سال	۱۶/۶۷	۱	۳۱/۵۸	۶
۵۵-۵۱ سال	۱۶/۶۷	۱	۲۱/۰۵	۴
۶۰-۵۶ سال	۱۶/۶۷	۱	۱۰/۵۳	۲
۷۰-۶۶ سال	-	-	۱۵/۷۹	۳
۷۵-۷۱ سال	۱۶/۶۷	۱	-	-
۸۰-۷۶ سال	۱۶/۶۷	۱	-	-
جمع کل	۱۰۰	۶	۱۰۰	۱۳

و میزان F محاسبه‌شده برای بار اول، دوم و سوم به‌ترتیب معادل η^2=۰/۳۵۲، P=۰/۰۰۴، (df=۱و۱۷)=۹/۲۲۴ با F؛ η^2=۰/۳۸۳، P=۰/۰۰۱، (df=۱و۱۷)=۱۰/۵۵۰ با F؛ η^2=۰/۳۵۴، P=۰/۰۰۴، (df=۱و۱۷)=۹/۳۲۹ با F به‌دست آمد؛ زیرا سطح معناداری کمتر از آلفای میزان‌شده Bonferroni (۰/۰۰۵) است؛ بنابراین F محاسبه‌شده به لحاظ آماری معناداری بود؛ از این رو می‌توان گفت که از نظر آماری تفاوت معناداری میان میزان تولید آنزیم پروتئیناز با دو نوع سرطان (هماتولوژیک و سرطان اعضا) وجود دارد. نتایج آنالیز واریانس نیز حاکی از آن است که میانگین میزان تولید آنزیم پروتئیناز در تکرار اول، دوم و سوم در بیماران مبتلا به سرطان بسیار بیشتر از افراد غیرسرطانی می‌باشد.

بحث

گونه‌های کاندیدا، میکرو ارگانیسم‌های بیماری‌زای فرصت‌طلبی هستند که با چندین ویژگی ویرولانس قادر به هجوم به بافت‌های میزبان و جلوگیری از مکانیزم‌های دفاعی سیستم ایمنی بدن می‌باشند. یکی ازمهم‌ترین عوامل ویرولانس، آنزیم‌های هیدرولیتیک هستند که به‌صورت خارج سلولی توسط عوامل مخمری کاندیدا ترشح می‌شوند. این آنزیم‌ها توسط قارچ برای تجزیه بافت‌های خارجی، جلوگیری از سیستم دفاعی میزبان و به‌دست‌آوردن آمینو اسیدهایی که برای متابولیسم مخمر مورد نیاز هستند به کار می‌روند (۱۳،۱۲). وجود این آنزیم‌ها با مراحل مختلف نفوذ به بافت میزبان و در نتیجه بیماری‌زایی ثابت شده است (۱۴). در یکی از مطالعات صورت‌گرفته در این زمینه که در آن میزان تولید آنزیم پروتئیناز در ۱۱۰ ایزوله بالینی کاندیدا مورد بررسی قرار گرفت، ۶۵ ایزوله (۵۹/۱ درصد) موارد مثبت گزارش گردید. علاوه‌براین، میزان تولید آنزیم پروتئیناز توسط گونه کاندیدا آلبیکنس معادل ۸۲/۱ درصد و کاندیدا گلابراتا برابر با ۴۲/۸ درصد به‌دست آمد (۱۵) که از این نظر با مطالعه حاضر مطابقت داشت. Oliveira و همکاران (۲۰۱۳) نیز در پژوهش خود میزان تولید آنزیم پروتئیناز در ۹۰ گونه مختلف کاندیدا را مورد بررسی قرار دادند. نتایج پژوهش آن‌ها میزان ترشح آنزیم پروتئیناز را در ۱۶ استرین (۱۷/۸ درصد) مثبت نشان داد که بیشترین میزان مربوط به گونه کاندیدا پاراپسیلوزیس (۱۵/۳ درصد) بود (۱۶). علاوه‌براین، Deepa و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی خود میزان تولید آنزیم پروتئیناز را ۸۶/۸ درصد در ۳۸ گونه مختلف کاندیدای جداشده از ضایعات دهانی گزارش نمودند (۱۷). Sacristán و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱ میزان تولید آنزیم پروتئیناز را معادل ۸۳/۳ درصد در ۱۷ ایزوله کاندیدای جداشده از نمونه آسپیره‌شده برونش از بیماران ICU ثبت کردند (۱۸). در این پژوهش نیز تولید آنزیم پروتئیناز در هر دو گونه کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا تأیید گردید. شایان ذکر است که میزان تولید پروتئیناز در این مطالعه بالا بود که این امر نشان‌دهنده نقش مهم این آنزیم در ویرولانس و حمله به سلول‌های مخاطی بافت دهان می‌باشد (حدوداً ۲/۲۱ میلی‌متر). از سوی دیگر، در این مطالعه اختلاف معناداری در فعالیت پروتئیناز بین ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا مشاهده نشد؛ با این حال میزان تولید آنزیم پروتئیناز تاحدودی در ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس بیشتر بود. نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش با یافته‌های Kantarcioğlu و Yücelمشابه بود (۱۹). Sun و همکاران نیز در مطالعه‌ای که در ارتباط با تولید پروتئیناز، فسفولیپاز و توانایی تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های کاندیدایی جداشده از خون انجام دادند، عنوان نمودند که میزان تولید آنزیم پروتئیناز در گونه‌های آلبیکنس و غیرآلبیکنس تفاوت زیادی ندارد و تمامی این ایزوله‌ها نشان‌دهنده فعالیت آنزیم پروتئیناز می‌باشند. این پژوهشگران میزان تولید آنزیم فسفولیپاز را به‌صورت معناداری در گونه‌های کاندیدا

آلبیکنس بیشتر از گونه‌های غیرآلبیکنس گزارش نمودند (۵). قابل ذکر است که اختلاف چشمگیری در فعالیت پروتئیناز بین ایزوله‌های کاندیدا آلبیکنس و گلابراتا در این مطالعه وجود نداشت؛ البته میزان تولید پروتیئناز تاحدودی در کاندیدا آلبیکنس بیشتر بود که چندان قابل توجه نمی‌باشد. نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش با یافته‌های Kantarcioglu و Yucel که فعالیت آنزیم آسپارتیل پروتئیناز را در تمامی نژادها کشف کردند، همخوانی دارد.

باید عنوان نمود که در بین بیماران غیرسرطانی دارای علائم برفک دهانی، بیشتر افرادی که نتایج کشت آن‌ها کاندیدا آلبیکنس را نشان داد، مبتلا به دیابت بودند؛ زیرا دیابت به‌عنوان یک عامل مستعدکننده رشد کاندیدا محسوب می‌شود. افزایش قند خون در بیماری دیابت ملتوس توانایی چسبندگی کاندیدا آلبیکنس را به سطح سلول‌های موکوسی دهان افزایش داده و این افراد را مستعد ابتلا به اورال کاندیدیازیس می‌نماید (۲۰). این نتیجه نیز مطابق با یافته‌های مطالعات انجام‌شده قبلی می‌باشد. در این راستا، یاراحمدی و همکاران در سال ۱۳۸۱ طی پژوهشی که در مورد میزان شیوع اورال کاندیدیازیس در افراد دیابتی انجام دادند، درصد بالای کاندیدیازیس دهانی در افراد دیابتی را ثابت کردند. همچنین، سنجش تولید آنزیم پروتئیناز در افراد غیرسرطانی مشخص نمود که میزان تولید آنزیم در افراد دیابتی بالاتر از بقیه بوده است که این نتیجه با یافته‌های پژوهش Tsang و همکاران که در سال ۲۰۰۷ در ارتباط با بیماران مبتلا به دیابت انجام شد، مطابقت داشت. این نتایج نشان‌دهنده آن است که دیابت عامل محرک در افزایش تولید آنزیم و قدرت تهاجمی کاندیدا آلبیکنس می‌باشد. احتمالاً دو دلیل افزایش ترشح آنزیم پروتئیناز در افراد سرطانی مبتلا به کاندیدیازیس دهانی نسبت به افراد غیرسرطانی این است که سلول‌های سرطانی با رشد غیرقابل‌کنترل سلول‌های نئوپلاستیک و تهاجم این سلول‌های سرطانی به سایر نواحی به‌صورت انتشار مستقیم یا غیرمستقیم از طریق خون و سطوح سروزی می‌شود (۲۰). از سوی دیگر، درمان‌های رادیوتراپی و شیمی‌درمانی بر پایه حذف سلول‌های با تکثیر سریع بدون ازبین‌بردن سلول میزبان عمل می‌کنند که این روند باعث کاهش فعالیت سلول‌های سیستم ایمنی بدن می‌شود؛ بنابراین شانس ابتلا به عفونت‌های فرصت‌طلبی چون کاندیدا آلبیکنس را در دهان این دسته از افراد افزایش می‌دهد.

نتیجه‌گیری

تولید و ترشح آنزیم پروتئیناز می‌تواند به‌عنوان یک فاکتور ویرولانس مهم در ایجاد بیماری کاندیدیازیس دهانی در افراد سرطانی به مراتب بیشتر از افراد غیرسرطانی باشد؛ بنابراین سنجش میزان تولید این آنزیم ممکن است تعیین‌کننده ارتباط بین گونه و پیشرفت عفونت باشد. مقایسه آنزیم پروتئیناز در دو گروه افراد سرطانی و غیرسرطانی، اختلافی فاحش در تولید آنزیم در بیماران سرطانی را نشان می‌دهد که ناشی از سرکوب شدید سیستم ایمنی در این افراد می‌باشد که آن‌ها را مستعد ابتلا به انواع عفونت‌های موضعی و منتشر کاندیدا می‌نماید و به علت پایین‌بودن و کاهش شدید سلول‌های ایمنی به‌ویژه نوتروفیل‌ها، این ارگانیسم‌های فرصت‌طلب به شدت در دهان این افراد کلونیزه شده و با تولید آنزیم بیشتر، عوارض بیشتر و شدیدتری را برای این بیماران به همراه می‌آورند. در برخی از موارد این عفونت‌های دهانی می‌توانند به عفونت منتشر یا سپتیسمی منجر شده و کاندیدیازیس سیستمیک ایجاد کنند که یک عفونت خطرناک و کشنده برای بیماران سرطانی محسوب می‌شود. امید است با شناسایی و تشخیص به موقع کاندیدا آلبیکنس در افراد سرطانی، استفاده از مقادیر مناسب دارو و شناسایی

گونه‌های کاندیدا آلبیکنس مقاوم به دارو از افزایش ویرولانس و کلونیزه‌شدن بیشتر مخمر و نیز افزایش تولید آنزیم‌های آن که قدرت تهاجمی کاندیدا را افزایش می‌دهند، کاسته شود.

حمایت مالی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی

افرادی که برای شرکت در پژوهش رضایت داشتند، فرم رضایت آگاهانه را تکمیل نمودند.

تضاد منافع

نویسندگان در نتایج حاصل از پژوهش هیچگونه تضاد منافعی ندارند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت‌های بی‌دریغ دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن در اجرای این تحقیق صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. Postgraduate medical journal. 2002;78(922):455-9.
2. Meurman J, Siikala E, Richardson M, Rautemaa R. Non-Candida albicans Candida yeasts of the oral cavity. Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology. 2007;1(1):719-31.
3. Al-Abeid HM, Abu-Elteen KH, Elkarmi AZ, Hamad MA. Isolation and characterization of Candida spp. in Jordanian cancer patients: prevalence, pathogenic determinants, and antifungal sensitivity. Jpn J Infect Dis. 2004;57(6):279-84.
4. Calamari S-E, Bojanich M-A, Barembaum S-R, Berdicevski N, Azcurra A-I. Antifungal and post-antifungal effects of chlorhexidine, fluconazole, chitosan and its combinations on Candida albicans. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011;16(1):E23-E8.
5. Sun J, Qi C, Lafleur MD, Qi Q-g. Fluconazole susceptibility and genotypic heterogeneity of oral Candida albicans colonies from the patients with cancer receiving chemotherapy in China. International journal of oral science. 2009;1(3):156.
6. Widmer F, Wright LC, Obando D, Handke R, Ganendren R, Ellis DH, et al. Hexadecyl-phosphocholine (miltefosine) has broad-spectrum fungicidal activity and is efficacious in a mouse model of cryptococcosis. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2006;50(2):414-21.
7. Cronin UP, Wilkinson MG. Monitoring growth phase-related changes in phosphatidylcholine-specific phospholipase C production, adhesion properties and physiology of Bacillus cereus vegetative cells. Journal of industrial microbiology & biotechnology. 2008;35(12):1695-703.
8. Mandujano-González V, Villa-Tanaca L, Anducho-Reyes MA, Mercado-Flores Y. Secreted fungal aspartic proteases: A review. Revista Iberoamericana de Micología. 2016 33(2):76-82.
9. Parra-Ortega B, Hernández-Rodríguez C, Villa-Tanaca L. Evolution of GPI-Aspartyl Proteinases (Yapsines) of Candida spp: INTECH Open Access Publisher; 2011, 257pp.
10. Richardson MD, Warnock DW. Fungal infection: diagnosis and management: John Wiley & Sons; 2012, 476 pp.
11. Galan-Ladero M, Blanco M, Sacristán B, Fernández-Calderón M, Pérez-Giraldo C, Gomez-Garcia A. Enzymatic activities of Candida tropicalis isolated from hospitalized patients. Medical mycology. 2010;48(1):207-10.
12. Bhat V, Sharma S, Shetty V, Shastry C, Rao V. Extracellular enzymes of Candida albicans and their role in development of denture stomatitis-a review. JIADS. 2011;2(1):26-30.
13. de Cássia Mardegan R, Foglio MA, Gonçalves RB, Höfling JF. Candida albicans proteinases. Brazilian Journal of Oral Sciences. 2015;5(16):944-52.
14. Cutler JE. Putative virulence factors of Candida albicans. Annual Reviews in Microbiology. 1991;45(1):187-218.
15. Sachin C, Ruchi K, Santosh S. In vitro evaluation of proteinase, phospholipase and haemolysin activities of Candida species isolated from clinical specimens. International journal of Medicine and Biomedical

research. 2012;1(2):153-7.
16. Oliveira SKR, Anjos DCVd, Gonçalves LHB, Ferro TAF, Monteiro SG, Figueiredo PdMS, et al. Prevalence and production of enzymes by Candida isolates from vaginal secretion samples. Rev Patol Trop. 2013;42:161-76.
17. Deepa K, Jeevitha T, Michael A. In vitro evaluation of virulence factors of Candida species isolated from oral cavity. Journal of Microbiology and Antimicrobials. 2015;7(3):28-32.
18. Sacristán B, Blanco M, Galan-Ladero M, Blanco J, Perez-Giraldo C, Gómez-García A. Aspartyl proteinase, phospholipase, hemolytic activities and biofilm production of Candida albicans isolated from bronchial aspirates of ICU patients. Medical mycology. 2011;49(1):94-7.
19. Kantarcioğlu AS, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical Candida isolates with reference to the sources of strains. Mycoses. 2002;45(5-6):160-5.
20. Tsang C, Chu F, Leung W, Jin L, Samaranayake L, Siu S. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of Candida albicans isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. Journal of medical microbiology. 2007;56(10):1393-8.

Volume 20, Issue 63, Autumn 2017, Pages: 9-19

Original Article

Measurement of Proteinase Enzyme Produced in *Candida* Species Isolated from Oral Candidiasis in Cancer Patients Receiving Chemotherapy at the Hospitals of Tonekabon and Ramsar, Iran

Somayeh Moghimyan[1*], Ayatollah NasrollahiOmran[2], Shahrbanoo Keyhanian[3]

[1] MSc, Department of Microbiology, Islamic Azad University of Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran
[2] PhD, Department of Medical Mycology, Faculty of Medical Sciences, Islamic Azad University of Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran
[3] MD, Department of Oncology and Adult Cancer, Faculty of Medical Sciences, Islamic Azad University of Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

Received: 08 Aug 2017 **Accepted:** 02 May 2018

Abstract

Introduction: Candidiasis is a common fungal infection caused by various *Candida* species. The production of extracellular enzymes, like proteinase, as a pathogenic factor plays a significant role in yeast adherence and penetration to the host. Regarding this, the present study was conducted to evaluate the production of proteinase enzyme in cancer patients with oral candidiasis.

Materials and Methods: A total of 20 oral swab specimens were collected from cancerous and non-cancerous patients with oral candidiasis referring to the Oncology Center of Ramsar and Tonekabon hospitals, Iran, in 2014-2015. The samples obtained from the cancerous and non-cancerous patients were assigned into the case and control groups, respectively. These specimens were cultured in Sabouraud dextrose agar containing chloramphenicol. The yeast isolates were identified by means of phenotypic method. The evaluation of proteinase enzyme activity was accomplished on a specific medium. The diameter of the halo formed around each colony was also measured to determine the rate of enzyme production.

Results: Out of the 20 samples, 19 (95%) and 6 (30%) *Candida* species were isolated from the case and control groups, respectively. *Candida albicans and Candida glabrata* had the prevalence of 16 (84%) and 3 (16%), respectively. In the control group, all isolated yeasts were identified as *Candida albicans*. The mean diameter of the halo around the yeast cells producing proteinase enzyme in cancer patients with oral candidiasis was 2.21 mm in comparison to the non-cancerous group.

Conclusion: Proteinase enzyme production as an important virulence factor leading to oral candidiasis was significantly higher in the cancer patients than that in the non-cancer ones.

Keywords: Bacto agar, Cancer, *Candida* species, CHROM agar, Hematological cancer, Immune deficiency, Oral candidiasis, Peptone Agar, Proteinase

**** Corresponding Author:*** Somayeh Moghimyan, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran. Tel : 09111932449; Email: negin.moghimian@yahoo.com